Agilent ChemStation pour le Spectrophotomètre UV-visible

Manuel d'utilisation du Logiciel d'Analyse Biochimique

Agilent Technologies

Avertissements

© Agilent Technologies, Inc. 2002-2003

Conformément aux lois nationales et internationales relatives à la propriété intellectuelle, toute reproduction totale ou partielle de ce manuel sous quelque forme que ce soit, par quelque moyen que ce soit, voie électronique ou traduction, est interdite sans le consentement écrit préalable de la société Agilent Technologies, Inc.

Référence du manuel

G1117-93008

Edition

10/2003

Imprimé en Allemagne

Agilent Technologies Deutschland GmbH
Hewlett-Packard-Strasse 8
76337 Waldbronn

Garantie

Les informations contenues dans ce document sont fournies “en l'état” et pourront faire l'objet de modifications sans préavis dans les éditions ultérieures. Dans les limites de la législation en vigueur, Agilent exclut en outre toute garantie, expresse ou implicite, quant à ce manuel et aux informations contenues dans ce dernier, notamment, mais sans s'y restreindre, toute garantie marchande et aptitude à un but particulier. En aucun cas, Agilent ne peut être tenu responsable des éventuelles erreurs contenues dans ce document, ni des dommages directs ou indirects pouvant découler des informations contenues dans ce document, de la fourniture, de l'usage ou de la qualité de ce document. Si Agilent et l'utilisateur ont souscrit un contrat écrit distinct dont les conditions de garantie relatives au produit couvert par ce document entrent en conflit avec les présentes conditions, les conditions de garantie du contrat distinct se substituent aux conditions stipulées dans le présent document.

Licences technologiques

Le matériel et le logiciel décrits dans ce document sont protégés par un accord de licence et leur utilisation ou reproduction sont soumises aux termes et conditions de ladite licence.

Limitation des droits

L'utilisation du logiciel dans le cadre d'un contrat principal ou de sous-traitance avec le Gouvernement américain est soumise à la réglementation fédérale des Etats-Unis régissant les logiciels informatiques commerciaux (DFAR 252.227-7014, juin 1995) ou les produits commerciaux (FAR 2.101(a)) ou les logiciels informatiques sous licences (FAR 52.227-19, juin 1987) ou toute réglementation ou clause de contrat équivalente. L'utilisation, la duplication ou la publication de ce logiciel est soumise aux termes de la licence commerciale standard délivrée par Agilent Technologies. Conformément à la directive FAR 52.227-19(c)(1-2) (juin 1987), les droits d'utilisation accordés aux départements et agences rattachés au Gouvernement américain sont limités aux termes de la présente limitation des droits. Les droits d'utilisation accordés au Gouvernement américain dans le cadre des données techniques sont limités conformément aux directives FAR 52.227-14 (juin 1987) ou DFAR 252.227-7015 (b)(2) (novembre 1995).

Mentions de sécurité

ATTENTION

Une mention **ATTENTION** signale un danger. Si la procédure, le procédé ou les consignes ne sont pas exécutés correctement, le produit risque d'être endommagé ou les données d'être perdues. En présence d'une mention **ATTENTION**, vous devez continuer votre opération uniquement si vous avez totalement assimilé et respecté les conditions mentionnées.

AVERTISSEMENT

Une mention AVERTISSEMENT signale un danger. Si la procédure, le procédé ou les consignes ne sont pas exécutés correctement, les personnes risquent de s'exposer à des lésions graves. En présence d'une mention AVERTISSEMENT, vous devez continuer votre opération uniquement si vous avez totalement assimilé et respecté les conditions mentionnées.

Contenu de ce manuel

Avec le logiciel d'analyse biochimique ChemStation Agilent, le logiciel général s'enrichit de deux nouveaux modes : le mode cinétique et le mode thermodénaturation. Ces modes permettent d'effectuer des expériences de cinétique et de thermodénaturation avec le spectrophomètre Agilent 8453. Pour cela, il a été doté de fonctions de développement de méthodes d'analyse, de moniteurs en ligne pour visualiser en temps réel les expériences en cours, et enfin d'outils pour évaluer et traiter les données expérimentales.

Ce manuel contient les instructions pour installer le logiciel et des indications sur le matériel nécessaire pour les expériences de cinétique et de thermodénaturation. Il donne également des renseignements sur les principales fonctions du logiciel pour vous aider à résoudre vos problèmes d'analyse.

Ce manuel est divisé en trois chapitres qui vous guideront pour la prise en main du logiciel, de l'installation à l'évaluation et à la présentation d'une expérience de cinétique ou de thermodénaturation.

1 Installation et configuration

Le Chapitre "Installation et configuration" décrit l'installation du logiciel ChemStation Agilent et la configuration du régulateur de température à effet Peltier Agilent 89090A, indispensable pour les expériences de thermodénaturation.

2 Mode cinétique

Le Chapitre "Mode cinétique" guide l'utilisateur tout au long des étapes de configuration du spectrophotomètre et du système d'échantillonnage, d'élaboration d'une méthode cinétique et d'exécution d'une mesure cinétique, jusqu'à l'évaluation des données expérimentales.

3 Mode thermodénaturation

Le Chapitre "Mode thermodénaturation" décrit la définition d'une rampe de température et d'une méthode d'analyse pour effectuer une expérience de thermodénaturation. Il donne des renseignements sur le moniteur en ligne et les possibilités d'évaluation des données offertes par le logiciel.

Sommaire

1 Installation et configuration 7

Installation du logiciel d'analyse biochimique 8

Configuration du régulateur de température à effet Peltier Agilent 89090A 9

2 Mode cinétique 11

Préparation d'une mesure cinétique 12

- Démarrage du mode cinétique (Kinetics) 12
- Configuration du spectrophotomètre 14
- Configuration du système d'échantillonnage 16
- Définition d'une méthode cinétique 18

Les mesures cinétiques 24

- Mesure temporelle 24
- Evaluation des données cinétiques 25
- Visualisation des résultats 27

3 Mode thermodénaturation 29

Préparation d'une mesure de thermodénaturation 30

- Démarrage du mode thermodénaturation 31
- Configuration du spectrophotomètre 32
- Réglage de la programmation de température 32
- Configuration d'une méthode de thermodénaturation 33

Essai de thermodénaturation 39

- Exécution d'un essai de thermodénaturation 39
- Evaluation de vos données de thermodénaturation 40
- Visualisation des résultats 41

Index 43

1
Installation et configuration

Installation du logiciel d'analyse biochimique 8
Configuration du régulateur de température à effet Peltier Agilent 89090A 9

Avant d'utiliser le logiciel d'analyse biochimique, il faut l'installer puis configurer le spectrophotomètre. Ce chapitre décrit les outils et procédures d'installation. La première chose à faire est d'installer le logiciel d'analyse biochimique sur la ChemStation Agilent.

Si vous voulez utiliser le mode thermodénaturation de la ChemStation Agilent, vous devez également configurer le régulateur de température à effet Peltier Agilent 89090A. Cette opération est facultative pour le mode cinétique.

Installation du logiciel d'analyse biochimique

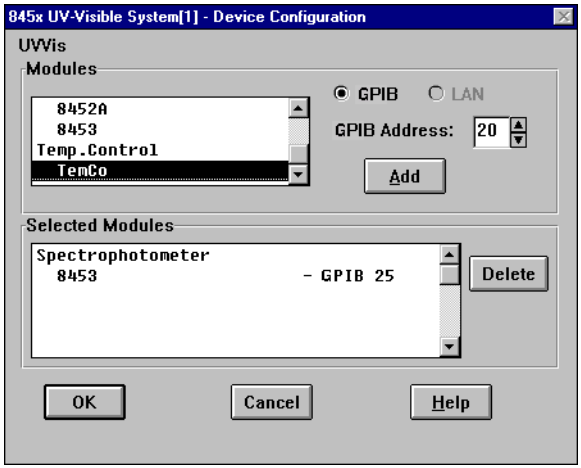
Le logiciel d'analyse biochimique (G1117A) est un module additionnel qui inclut le logiciel général (G1115A).

1. Insérez le CD-ROM ChemStation Agilent.
2. Lancez `setup.exe`.
3. Sélectionnez G1115AA "UV-VIS General Purpose ChemStation" dans la liste des produits disponibles (Available Products) et cliquez sur Add (Ajouter).
4. Entrez le numéro de licence du G1115AA et cliquez sur Add.
5. Sélectionnez G1117AA "UV-VIS Biochemical Add-on mode" dans la liste des produits disponibles (Available Products) et cliquez sur Add.
6. Entrez le numéro de licence du G1117AA et cliquez sur Add.
7. Cliquez sur OK.
8. Cliquez sur Install (Installer).
9. Quand l'installation est terminée, exécutez Installation Qualification (Qualification de l'installation) dans le menu ChemStation Agilent.
10. Si la qualification de l'installation est accordée, cela signifie que l'installation du logiciel d'analyse biochimique et du logiciel général est réussie.

Configuration du régulateur de température à effet Peltier Agilent 89090A

Si vous souhaitez utiliser le mode thermodénaturation du logiciel d'analyse biochimique, vous devez d'abord configurer le régulateur de température à effet Peltier Agilent 89090A.

1 Lancez l'éditeur de configuration UV-Vis (Configuration Editor) dans le menu ChemStation Agilent.



2 Si aucun instrument Agilent 8453 n'a encore été configuré, ajoutez un nouvel instrument (New Instrument) comme expliqué dans le *Manuel de l'opérateur du système de spectroscopie UV-visible Agilent 8453*.

3 Sélectionnez Instruments... dans le menu Configure (Configurer).

4 Entrez le nom de l'instrument (Instrument name), choisissez la taille initiale de la fenêtre (Initial Screen Window Size) et cliquez sur OK.

5 Sélectionnez TemCo.

6 Choisissez une adresse GPIB 20.

7 Cliquez sur Add (Ajouter) pour accepter la configuration.

8 Cliquez sur OK pour fermer la boîte de dialogue Device Configuration (Configuration du périphérique).

9 Fermez l'éditeur de configuration.

1 Installation et configuration

2
Mode cinétique

Préparation d'une mesure cinétique 12
Les mesures cinétiques 24

Ce chapitre décrit les principales tâches du mode cinétique du logiciel d'analyse biochimique. Une préparation correcte étant primordiale pour toute mesure cinétique, la première partie, "Préparation d'une mesure cinétique" page 12, donne des informations sur les étapes qui précèdent la mesure proprement dite. Vous apprendrez à configurer le spectrophotomètre et le système d'échantillonnage, et à définir une méthode d'analyse.

La seconde partie, "Les mesures cinétiques" page 24, décrit la mesure cinétique proprement dite et les possibilités de traitement et d'évaluation des données offertes par le logiciel ChemStation.

Préparation d'une mesure cinétique

Avant d'effectuer toute mesure temporelle, vous devez configurer votre système en fonction de votre application. Dans cette partie du chapitre, vous apprendrez à configurer votre spectrophotomètre, à sélectionner et configurer le système d'échantillonnage, et enfin à mettre au point une méthode cinétique. Cela vous permettra d'exploiter les fonctions du logiciel d'analyse biochimique afin de trouver la meilleure solution pour vos mesures cinétiques.

Démarrage du mode cinétique (Kinetics)

Pour lancer le mode cinétique du logiciel d'analyse biochimique, sélectionnez Kinetics (Cinétique) dans le menu Mode ou dans la liste déroulante des modes de l'interface graphique.

La Figure 1 montre l'interface graphique pour le mode cinétique du logiciel ChemStation. Le mode en cours est affiché dans la liste déroulante des modes de la barre d'outils. La barre d'outils contient également le champ du nom de la méthode où s'affiche le nom de la méthode analytique employée. Les lettres Mod à la suite du nom de la méthode signifient que cette méthode a été modifiée et que ces modifications n'ont pas encore été enregistrées. La barre d'outils contient également plusieurs boutons de raccourcis qui sont décrits en détail dans le *Manuel de l'opérateur du système de spectroscopie UV-visible Agilent 8453*.

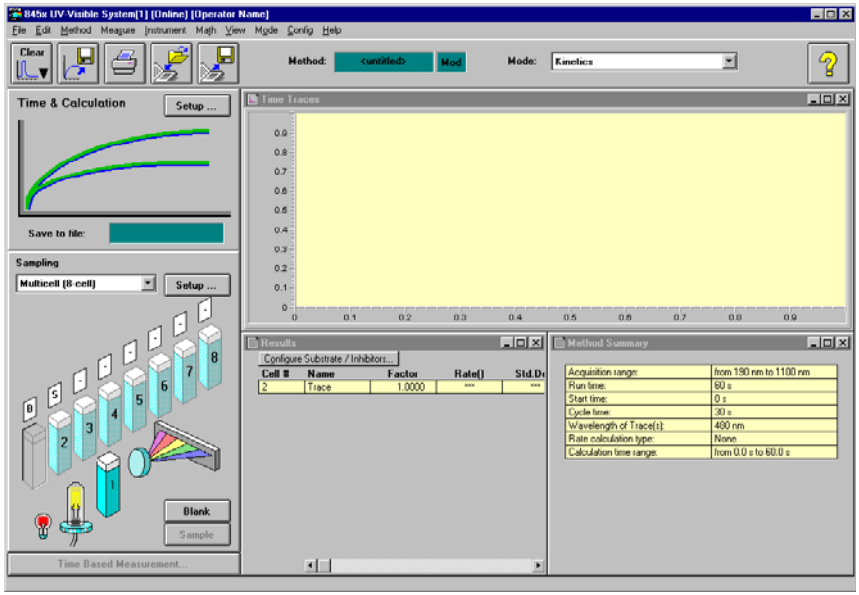


Figure 1 Interface graphique utilisateur du mode cinétique

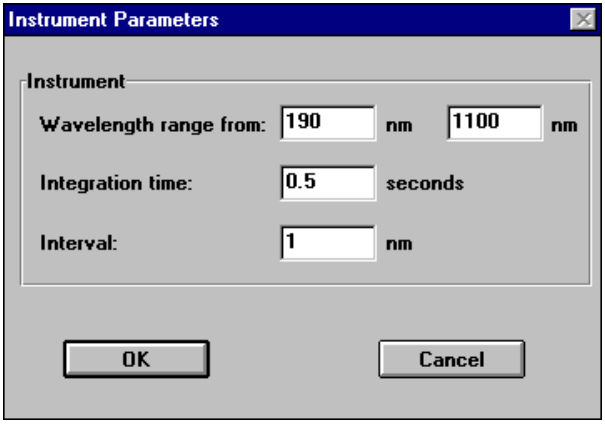
La barre latérale est divisée en deux. Le tableau de bord d'analyse (en haut) comporte un bouton Setup... (configurer) qui ouvre la boîte de dialogue des méthodes. Celle-ci contient les principaux paramètres des méthodes. Dans le tableau de bord de l'instrument (en bas), vous pouvez sélectionner le système d'échantillonnage et commander les lampes du spectrophotomètre.

L'interface graphique utilisateur, en mode cinétique, contient par défaut la fenêtre Time Trace (Tracé chronologique), la fenêtre Results (Résultats) et la fenêtre Method Summary (Résumé des méthodes). Après la mesure, ces fenêtres affichent les tracés cinétiques chronologiques, les données cinétiques évaluées et les principaux paramètres de la méthode.

Configuration du spectrophotomètre

Sélectionnez le menu Instrument du logiciel d'analyse biochimique pour configurer votre spectrophotomètre Agilent 8453 pour une mesure temporelle.

Choisissez Setup Spectrophotometer... (Configurer le spectrophotomètre) pour afficher la boîte de dialogue Instrument Parameters (paramètres de l'instrument) qui vous permettra de définir les paramètres de durée de l'analyse du spectrophotomètre. Les paramètres qui peuvent être définis dans cette boîte de dialogue sont les suivants.



- Vous pouvez utiliser les champs pour spécifier les limites inférieure et supérieure de la gamme de longueur d'onde correspondant à votre analyse. Le champ From (de) définit la limite inférieure, et le champ To (à) la limite supérieure de la gamme. Les valeurs par défaut sont les limites de longueurs d'ondes du spectrophotomètre configuré.

REMARQUE Ill est recommandé d'utiliser la gamme maximale de votre spectrophotomètre. Cela vous permettra de tirer pleinement parti des possibilités du spectrophotomètre à barrette de photodiodes, par exemple, l'évaluation postanalytique des données à différentes longueurs d'ondes.

- La valeur indiquée dans le champ Integration time (Durée d'intégration) est le temps exprimé en secondes, pendant lequel le signal est recueilli et intégré. La durée d'intégration doit être comprise entre 0,1 et 25,5 secondes ; la valeur par défaut est de 0,5 seconde. Une durée plus longue améliore le rapport signal/bruit, du fait que le signal est cumulé tandis qu'une moyenne du bruit est établie. La durée d'intégration sélectionnée a un impact direct sur le temps de cycle minimum des mesures cinétiques. Le temps de cycle minimum ne peut être inférieur à la durée d'intégration. On pourra donc être amené à réduire la durée d'intégration pour les mesures cinétiques rapides.
- Le nombre indiqué dans le champ Interval (intervalle) définit l'intervalle entre longueurs d'ondes. L'intervalle minimum est de 1 nm, ce qui correspond à la plus haute résolution.

REMARQUE Il est recommandé de ne pas modifier la valeur par défaut (1 nm) pour conserver les performances optimales du spectrophotomètre.

- Sélectionnez Lamp(s)... (lampe(s)) pour afficher la boîte de dialogue des paramètres des lampes (Lamp(s) Parameter). Elle vous permet de définir les paramètres des lampes du spectrophotomètre. Son format dépend du type de spectrophotomètre. Avec un spectrophotomètre 8453, vous avez la possibilité d'allumer (On) ou d'éteindre (Off) la lampe au deutérium et la lampe au tungstène. Les lampes peuvent également être commandées en cliquant sur les icônes correspondantes du tableau de bord de l'instrument situé dans la barre latérale de l'interface graphique.

REMARQUE Si vous changez les paramètres des lampes, la méthode en cours est modifiée, ainsi que l'état des lampes. En cas de défaillance d'une lampe (non-allumage, défaut de la lampe ou porte du compartiment des lampes ouverte), les paramètres des lampes peuvent indiquer que les lampes sont allumées, alors qu'elles sont éteintes. Pour connaître l'état réel des lampes, vérifiez-le dans la fenêtre Spectrophotometer Status (état du spectrophotomètre) ou dans le tableau de bord de l'instrument situé dans la barre latérale de l'interface graphique.

L'état réel du spectrophotomètre est résumé dans la fenêtre d'état du spectrophotomètre. On peut y voir les valeurs réelles suivantes :

type d'instrument, plage de longueur d'onde, intervalle de longueurs d'ondes, durée d'intégration, heure de mise en marche, état de la ou des lampes et état général du spectrophotomètre Agilent 8453 (prêt/non prêt).

Configuration du système d'échantillonnage

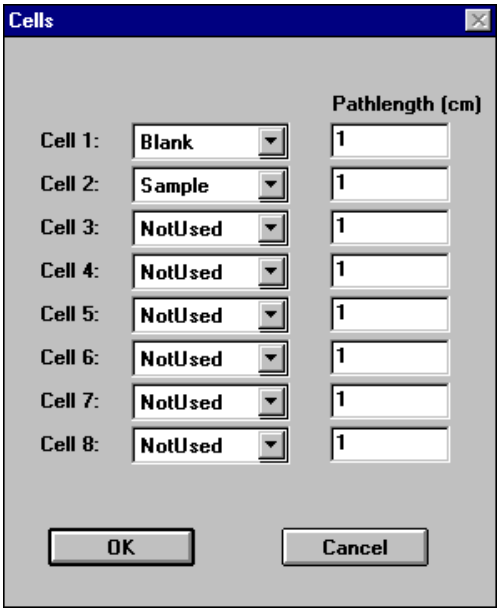
Le système d'échantillonnage peut être sélectionné et configuré soit dans le menu de l'instrument, soit dans le tableau de bord de l'instrument situé dans la barre latérale de l'interface graphique.

La commande Select Sampling System... (Sélectionner le système d'échantillonnage) affiche la boîte de dialogue du système d'échantillonnage dans laquelle vous pouvez sélectionner soit Manual (Fonctionnement manuel), soit le système de passeur de cuves 8 cuves ou 7 cuves. Si vous voulez utiliser le régulateur de température à effet Peltier (Agilent 89090A #100), vous devez sélectionner le système d'échantillonnage manuel.

ATTENTION Si vous passez de l'échantillonnage manuel au système de passeur de cuves, les résultats en cours du système à cuve unique sont ignorés.

La commande Setup Sampling System... (Configurer le système d'échantillonnage) affiche la boîte de dialogue Setup (Configurer) qui vous permet de définir les paramètres de durée d'analyse pour le système d'échantillonnage choisi.

La boîte de dialogue Cells (cuves) vous permet de définir les paramètres de durée d'analyse pour le passeur de cuves.

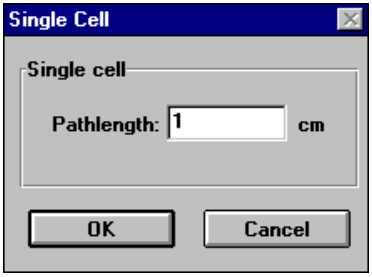


La boîte de dialogue présente les cuves utilisées sous la forme d'un tableau avec les colonnes suivantes :

- Cuve n : indique la position des cuves dans le passeur de cuves ; la cuve 1 est celle qui est la plus proche de l'avant du spectrophotomètre.
- La colonne centrale du tableau décrit l'échantillon qui se trouve dans la cuve. Sélectionnez Sample (Echantillon), Blank (Blanc) ou Not Used (Non utilisé) dans la liste déroulante.
- Les champs Path Length (Longueur du trajet optique) montrent en cm la longueur du trajet optique des cuves d'échantillon dans chaque emplacement du passeur de cuves. La valeur par défaut pour chaque cuve est de 1 cm.

REMARQUE Il est conseillé de prendre l'habitude d'utiliser l'emplacement 1 pour les mesures à blanc. De cette manière, le spectre de blanc est toujours renouvelé au début de tout cycle de mesures. Ceci est particulièrement important si vous effectuez des expériences cinétiques de longue durée.

La boîte de dialogue Single Cell (Cuve unique) vous permet de définir les paramètres de durée d'analyse en mode de fonctionnement manuel.



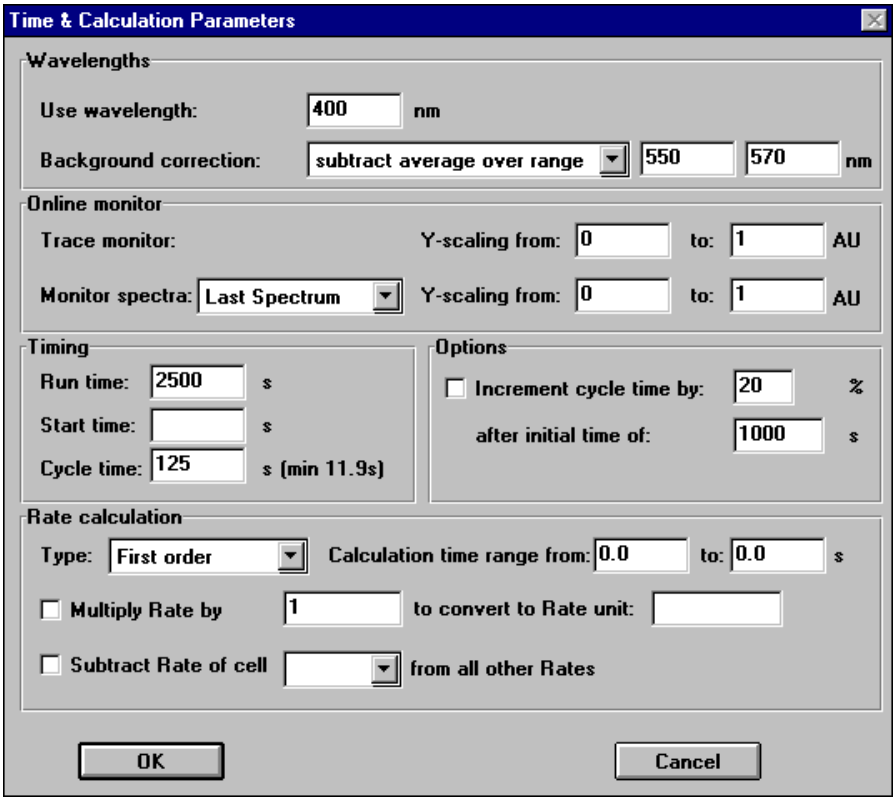
Le champ Path Length (Longueur du trajet optique) en cm de la cuve que vous utilisez doit être édité. La valeur par défaut est de 1 cm.

Sélectionnez Wait for Temperature Ready (Attendre que la température soit atteinte) pour que le logiciel ChemStation attende un signal «prêt» du régulateur de température à effet Peltier Agilent 89090A avant d'effectuer toute mesure. Par défaut, cette condition est supprimée. Cette case à cocher n'est activée que lorsque le régulateur de température Agilent 89090A est configuré.

Définition d'une méthode cinétique

Les paramètres des méthodes sont édités dans la boîte de dialogue Time & Calculation (Temps & calculs) et dans la boîte de dialogue Info & Options du menu Method (Méthode). La boîte de dialogue Time & Calculation s'affiche également quand on clique sur le bouton Setup (Configurer). Les principaux paramètres de la méthode sont affichés dans la fenêtre Method Summary (Résumé des méthodes) de l'interface graphique.

Dans la boîte de dialogue temps & calculs vous pouvez définir les conditions de la mesure temporelle.


Time & Calculation Parameters
Wavelengths
Use wavelength: 400 nm
Background correction: subtract average over range 550 570 nm
Online monitor
Trace monitor: Y-scaling from: 0 to: 1 AU
Monitor spectra: Last Spectrum Y-scaling from: 0 to: 1 AU
Timing
Run time: 2500 s
Start time: s
Cycle time: 125 s (min 11.9s)
Options
Increment cycle time by: 20 %
after initial time of: 1000 s
Rate calculation
Type: First order Calculation time range from: 0.0 to: 0.0 s
Multiply Rate by 1 to convert to Rate unit:
Subtract Rate of cell from all other Rates
OK
Cancel

- Le champ Use Wavelength (Utiliser la longueur d'onde) vous permet de définir la longueur d'onde (pour les mesures multicuves) ou jusqu'à six longueurs d'ondes (pour les mesures de cuve unique) des données traitées à partir desquelles les valeurs d'amplitude sont extraites pour produire le résultat. La longueur d'onde par défaut est 480 nm. Si vous entrez des longueurs d'ondes pour lesquelles aucune donnée mesurée n'est disponible (par exemple des non-entiers), les valeurs d'amplitude sont calculées par interpolation linéaire.
- Le champ Background Correction (Soustraction du bruit de fond) vous permet de spécifier toute soustraction du bruit de fond appliquée au résultat par longueur d'onde pour calculer le résultat d'une fonction. Choisissez la flèche vers le bas et sélectionnez une procédure de soustraction du bruit de fond dans la liste déroulante :

none (aucune) – indique que le résultat par longueur d'onde est celui qui a été mesuré, sans soustraction du bruit de fond.

single reference wavelength (une seule longueur d'onde de référence) – indique que l'absorbance à une seule longueur d'onde est soustraite du résultat par longueur d'onde. Spécifiez la longueur d'onde du bruit de fond dans ce champ.

subtract average over a range (soustraire la valeur moyenne sur une gamme) – indique que l'absorbance moyenne sur une gamme de longueurs d'ondes est soustraite du résultat par longueur d'onde. Précisez les limites supérieure et inférieure de la gamme des longueurs d'ondes du bruit de fond dans ces champs.

three-point drop-line (correction proportionnelle) – indique qu'une absorbance de fond calculée avec une correction proportionnelle est soustraite du résultat par longueur d'onde. Spécifiez les limites supérieure et inférieure de la gamme de longueurs d'ondes de fond utilisée pour le calcul du bruit de fond dans les champs gauche (inférieure) et droit (supérieure) adjacents.

- Le suivi des tracés (Trace Monitor) est un graphe continuellement mis à jour qui montre l'évolution dans le temps de l'absorbance à la longueur d'onde spécifiée dans le champ Use Wavelength (utiliser la longueur d'onde). Définissez l'échelle de l'axe d'absorbance (y) en tapant les limites inférieure et supérieure dans les champs Y scaling from: (échelle en y à partir de) et to: (jusqu'à).
- Vous pouvez soit suivre le dernier spectre acquis, soit les spectres d'une cuve spécifique. Sélectionnez la flèche vers le bas et choisissez soit Last Spectrum (Dernier spectre), soit Cell n (cuve n) pour les mesures multicuves, soit All Spectra (Tous les spectres) pour les mesures à cuve unique. Définissez l'échelle de l'axe de l'absorbance (y) en tapant les limites inférieure et supérieure dans les champs Y scaling from: (Echelle en y à partir de) et to: (jusqu'à).
- La durée d'analyse (Run Time) est la durée totale de l'analyse. La fourchette va jusqu'à 999999 secondes (11,5 jours). La durée d'analyse doit être supérieure au temps de cycle auquel on ajoute le temps de début d'analyse (Start Time).
- Le temps de début d'analyse est le temps qui s'écoule entre le moment où la procédure de mesure est lancée et où la mesure démarre réellement ; il est facultatif. La valeur par défaut est 0,0.

- Le temps de cycle est le temps qui s'écoule entre le démarrage d'une mesure et le démarrage de la mesure suivante ; la valeur par défaut est de 5,0 secondes pour une mesure multicuve, 0,5 seconde pour une mesure à cuve unique (valeurs minimum acceptables).
- Le temps de cycle minimum dépend du matériel utilisé et la valeur indiquée n'est qu'une approximation. Pour éviter de perdre des données, vous devez déterminer de manière expérimentale le temps de cycle minimal pour votre configuration. Le temps de cycle minimal dépend du système d'échantillonnage (nombre de mesures par cycle), du temps d'intégration (défini dans la boîte de dialogue Setup Spectrophotometer...) et de la correction de la lumière parasite (définie dans la boîte de dialogue Info & Options).
- Sélectionnez Increment cycle time (Incrémenter le temps de cycle) pour activer l'augmentation du temps de cycle. Spécifiez le pourcentage d'augmentation dans le champ % et un intervalle de temps (en secondes) dans le champ after initial time of: (après un temps initial de :).
- Vous pouvez choisir parmi cinq types d'évaluation cinétique différents. Choisissez la flèche vers le bas et sélectionnez le type de calcul dans la liste déroulante :

  None (aucun) indique qu'aucun calcul de vitesse n'est effectué.

  Initial rate (vitesse initiale) — indique qu'un ajustement quadratique est effectué selon l'équation $a+bt+ct^2$ où b est la constante de vitesse initiale.

  Zero order (ordre zéro) — indique qu'un ajustement linéaire est effectué selon l'équation
  a + bt où b est la constante de vitesse en DO/s.

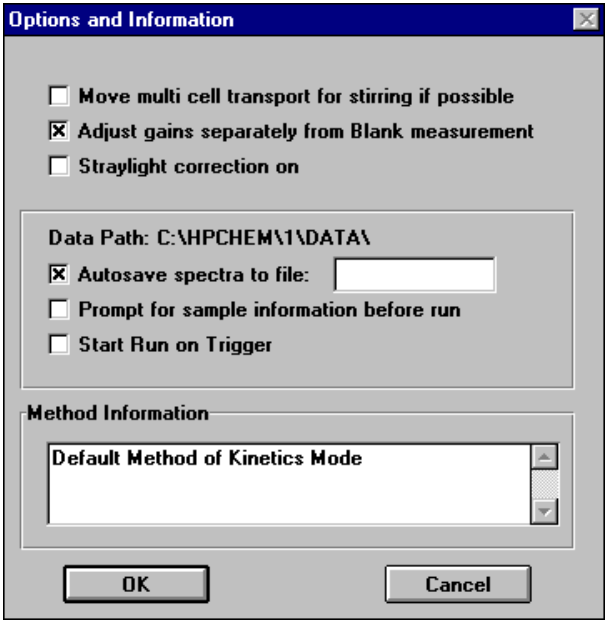
  First order (premier ordre) — indique qu'un ajustement exponentiel est effectué selon l'équation
  $a+b \cdot \exp(-kt)$ où k est la constante de vitesse en 1/s.

  Delta AU — indique que l'absorbance initiale est soustraite de l'absorbance finale :
  $Abs_{t(fin)} - Abst_{(début)}$
- Vous pouvez spécifier que le calcul de vitesse est effectué dans une fourchette de temps limitée. Tapez l'heure de démarrage du calcul dans le champ from: (à partir de :) et l'heure de fin dans le champ to: (à :).

- Sélectionnez Multiply Rate (Multiplier la vitesse) pour activer un facteur de conversion du résultat de vitesse. Spécifiez le facteur et les nouvelles unités dans le champ To convert to rate unit: (convertir en unité de vitesse :).

Sélectionnez Subtract Rate of Cell (Soustraire la vitesse de la cuve) pour soustraire le résultat d'une cuve de référence des résultats de toutes les autres cuves. Choisissez la flèche vers le bas et sélectionnez la cuve de référence dans la liste déroulante. Cette option n'est disponible que si vous avez défini une mesure multicuve.

Dans la boîte de dialogue Options & Information vous pouvez définir les conditions d'acquisition pour l'expérience cinétique.



- L'option Move multicell transport for stirring if possible (Déplacer le passeur de cuves pour agitation si possible) place la cuve en cours sur la position permettant l'agitation de l'échantillon pendant le temps de repos entre deux cycles, si le temps de cycle défini est suffisamment long (environ le temps de cycle minimum plus 4 secondes pour chaque cuve configurée). Cette case à cocher est disponible uniquement quand un système de passeur de cuves est sélectionné.

- L'option Adjust gains separately from blank measurement (Régler les gains séparément de la mesure à blanc) ajoute la commande Set Gains (Définir les gains) dans le menu Measure (Mesures). Set Gains effectue un réglage des gains, une référence et une mesure ; la commande Blank (Blanc) effectue seulement une référence et une mesure. Le réglage séparé du gain sur un blanc à fort pouvoir de transmission (par exemple de l'eau ou une solution tampon) donne aux gains une valeur inférieure afin d'éviter tout dépassement de la capacité du convertisseur A/N et tout point de données à rejeter en raison des tracés chronologiques à pentes négatives.
- L'option Straylight Correction On (Correction de lumière parasite activée) permet de commander la correction de lumière parasite. Quand cette fonction est activée, une seconde mesure est effectuée avec le filtre optique et le spectre de l'échantillon est corrigé à l'aide de ce spectre. La correction de lumière parasite augmente le temps de cycle minimum du temps d'intégration (défini dans la boîte de dialogue des paramètres de l'instrument) plus 2 secondes.
- Cochez Autosave spectra to file (Enregistrement automatique des spectres dans un fichier) pour enregistrer sur le disque tous les spectres acquis. Tapez un nom de fichier dans le champ adjacent. Les spectres sont enregistrés dans le répertoire par défaut (HPCHEM\n\DATA) avec l'extension .KD. Le répertoire par défaut peut être modifié dans le menu Config (Configuration)
- L'option Prompt for sample information before run (Demander l'info. échantillon avant analyse) affiche la boîte de dialogue Sample Information (Informations échantillon) avant le démarrage des mesures.
- Sélectionnez Start Run on Trigger (Démarrer l'analyse sur déclenchement) pour lancer l'acquisition des données par fermeture des contacts 13 et 15 de l'interface GPIO. De cette façon, il s'écoulera un temps minimal (environ 0,12 seconde) entre l'action de déclenchement et le démarrage de l'acquisition des données ; cette fonction est destinée à la cinétique des réactions rapides.
- Vous pouvez saisir une description de la méthode dans le champ Method Information (Informations méthode). Ce champ accepte tous les caractères alphanumériques, et la description peut être aussi longue que vous le souhaitez. Le texte revient automatiquement à la ligne en fin de ligne. Vous pouvez éditer une description existante à l'aide de n'importe quelle procédure standard de traitement de texte (par exemple Copier, Couper, Coller).

Les mesures cinétiques

Mesure temporelle

Les mesures peuvent être démarrées soit en utilisant le menu Measure (mesure) dans la barre de menus, soit en cliquant sur les boutons Blank (Blanc), Sample (Echantillon), Time Based Measurement (Mesure temporelle) de la barre latérale de l'interface graphique, ou encore à l'aide de certaines touches de fonction.

Si vous avez sélectionné l'option Adjust gains separately from blank measurement (régler les gains séparément de la mesure à blanc) dans la boîte de dialogue Options & info..., l'option Set Gains (Réglage des gains) est incluse dans le menu Measure (Mesure). Le réglage séparé du gain sur un blanc à fort pouvoir de transmission (par exemple, de l'eau ou une solution tampon) donne aux gains une valeur inférieure et évite tout dépassement de la capacité du convertisseur A/N, ce qui permet de ne pas avoir à rejeter des points de données en raison de tracés chronologiques à pentes négatives.

1 Insérez une cuve remplie d'eau ou de tout autre milieu faiblement absorbant dans le porte-cuve ;.

2 Mettez le passeur de cuves dans la bonne position.

3 Cliquez sur Set gains (Réglage des gains) dans le menu Measure (Mesure).

Avec un système d'échantillonnage multicuve, il est recommandé de mesurer les spectres de compensation de cuve afin de corriger les légères différences de propriétés optiques des cuves. Il faut initialiser le passeur de cuves avec le même milieu blanc dans toutes les cuves. La commande Zero Cells... (Compensation de cuve) mesure un spectre blanc réel pour la cuve 1, puis mesure le spectre des autres cuves. Les spectres de différence sont obtenus en soustrayant le spectre du blanc du spectre de chaque cuve ; les spectres sont ensuite automatiquement soustraits de toutes les mesures de spectres ultérieures pour corriger toute différence optique entre les cuves.

1 Remplissez toutes les cuves du même milieu blanc (de l'eau, par exemple).

2 Vérifiez qu'il n'y a ni bulles, ni particules en suspension dans les cuves.

3 Effectuez une mesure de blanc en sélectionnant Blank (Blanc) dans le menu des mesures, en cliquant sur le bouton Blank (Blanc) dans la barre latérale de l'interface graphique, ou à l'aide de la touche F4.

4 Lancez la mesure de compensation des cuves dans le menu Measure (Mesure).

Les spectres de compensation des cuves s'affichent dans la fenêtre Zero Cells Spectra qui peut être activée dans le menu Vue. Veillez à ne pas changer les cuves de place après la mesure de compensation des cuves.

Pour mesurer un seul spectre de la solution qui est dans la cuve et l'afficher dans la fenêtre des spectres des échantillons (Sample Spectra), sélectionnez Sample (Single Spectrum) dans le menu Measure (Mesure). Vous pouvez aussi mesurer un seul spectre en appuyant sur la touche F5 ou en cliquant sur le bouton Sample (Echantillon) dans la barre latérale de l'interface graphique.

Appuyez sur la touche F7, sélectionnez Time based measurement (Mesure temporelle) dans le menu Measure (Mesure) ou dans la barre latérale de l'interface graphique pour préparer le logiciel à commencer la mesure temporelle. Les fenêtres Time Trace (Tracé chronologique) et Sample Spectra (Spectres des échantillons) apparaissent à l'écran. Choisissez Start (Démarrer) dans la barre de menus pour démarrer l'acquisition, ou Abort (Interrompre) pour interrompre une acquisition en cours.

Pendant la mesure temporelle, vous pouvez suivre l'acquisition des spectres et les tracés chronologiques en temps réel dans les fenêtres Time Trace (Tracé chronologique) et Sample Spectra (Spectres des échantillons). Double-cliquez avec le bouton gauche de la souris à l'intérieur de la fenêtre des tracés chronologiques ou des spectres des échantillons pour activer la fonction d'échelle automatique de l'axe des y.

Lorsque la mesure temporelle est terminée ou interrompue par l'utilisateur, les données de cinétique sont enregistrées comme spécifié dans la boîte de dialogue Options & Info... Les tracés chronologiques sont évalués par type de vitesse, selon ce qui a été défini dans la boîte de dialogue Time & Calculation (Temps et calculs). Les résultats sont affichés dans la fenêtre Results (Résultats).

Evaluation des données cinétiques

Lorsque la mesure temporelle est terminée, vous avez la possibilité de réévaluer les données cinétiques. Du fait que des spectres complets ont été acquis pendant la procédure de mesure, les paramètres des champs Wavelength (Longueur d'onde) et Rate Calculation (Calcul des vitesses) de la boîte de dialogue Time & Calculation peuvent être changés. Cliquez sur OK

pour activer les changements. Les nouveaux résultats s'affichent dans la fenêtre des résultats. Si des paramètres de la méthode ont été modifiés, le repère Mod apparaîtra sur l'interface graphique.

Si le système d'échantillonnage manuel a été configuré, vous pouvez choisir Edit Sample Information (Editer les informations échantillon) dans la fenêtre des résultats pour afficher la boîte de dialogue des informations échantillon (Sample Information). Elle vous permet d'adjoindre des informations échantillon à vos résultats. La boîte de dialogue contient les paramètres suivants :

- Le nom de l'échantillon.
- Un commentaire (par exemple une description de l'échantillon)
- La concentration d'un substrat dans le champ [S](mg/ml) ; ce champ ne sera présent que si vous avez sélectionné [S] ou [S][I] dans la boîte de dialogue Configure Substrate, Inhibitors (Configurer les substrats, les inhibiteurs).
- La concentration d'un inhibiteur dans le champ [I](mg/ml) ; ce champ ne sera présent que si vous avez sélectionné [S][I] dans la boîte de dialogue Configure Substrate, Inhibitors (Configurer les substrats, les inhibiteurs).
- La concentration du premier de deux substrats dans le champ [A](mg/ml) ; ce champ ne sera présent que si vous avez sélectionné [A][B] dans la boîte de dialogue Configure Substrate, Inhibitors (Configurer les substrats, les inhibiteurs).
- La concentration du second de deux substrats dans le champ [B](mg/ml) ; ce champ ne sera présent que si vous avez sélectionné [A][B] dans la boîte de dialogue Configure Substrate, Inhibitors (Configurer les substrats, les inhibiteurs).

Si un système de passeur de cuves a été configuré, vous pouvez choisir Configure Substrate/Inhibitors (Configurer les substrats, les inhibiteurs) dans la fenêtre Results (Résultats) pour afficher la boîte de dialogue Configure Substrate, Inhibitors. Elle vous permet d'adjoindre à vos résultats des informations sur les substrats et les inhibiteurs. Vous pouvez aussi sélectionner cette boîte de dialogue en cliquant sur le bouton de la boîte de dialogue Edit Sample Information (Editer les informations échantillon). La boîte de dialogue Configure Substrate, Inhibitors contient les paramètres suivants :

- None (Aucun) indique qu'aucun substrat ni inhibiteur n'est inclus.
- [S] indique qu'un substrat est inclus.

- [S][I] indique qu'un substrat et un inhibiteur sont inclus.
- [A][B] indique que deux substrats sont inclus.

Entrez les unités de concentration des substrats et des inhibiteurs dans le champ Unit (Unité).

REMARQUE TPour charger et évaluer des données anciennes produites par le logiciel HP 89532K, choisissez Import from *.MKD... (Importer de *.MKD) dans le menu fichier.

Visualisation des résultats

Vous avez plusieurs options pour visualiser les données acquises et traitées, ainsi que les résultats tabulés. Sélectionnez le menu View (Vue) qui contient les options suivantes :

- All Spectra (Tous les spectres) affiche dans la fenêtre Sample Spectra (spectres des échantillons) tous les spectres acquis.
- Spectra of Cell (Spectres d'une cuve) vous permet d'afficher les spectres d'une cuve spécifique dans la fenêtre des spectres des échantillons. Sélectionnez le numéro de cuve dans le sous-menu.
- Traces and Results (Tracés et résultats) affiche la fenêtre des tracés chronologiques, la fenêtre des résultats et le tableau de résumé des méthodes.
- Measured Single Spectra (Spectres uniques mesurés) affiche dans la fenêtre Single Spectra (Spectres uniques) un spectre mesuré.
- Last Blank Spectrum (Dernier spectre de blanc) affiche la fenêtre du dernier spectre de blanc.
- Zero Cell Spectra (Spectres de compensation de cuve) est inclus dans le menu View (Vue) si vous avez configuré un système de passeur de cuves. Il affiche la fenêtre Zero Cell Spectra (spectres de compensation de cuve).
- Math Results (Résultats mathématiques) affiche la fenêtre des résultats mathématiques.

- Tabulate Selected Spectrum/Trace (Tabuler le spectre/tracé sélectionné) affiche sous forme tabulaire les données du tableau des spectres pour le spectre sélectionné, ou celles du tableau des tracés chronologiques pour le tracé chronologique sélectionné. Ces tableaux peuvent également être affichés automatiquement en double-cliquant avec le bouton gauche de la souris sur un spectre ou un tracé chronologique à l'intérieur d'une fenêtre graphique, ou en appuyant sur Entrée si vous utilisez le curseur. Le titre du tableau indique le type de spectre (par exemple Sample (échantillon), Standard (étalon)) ainsi que le numéro du spectre/tracé chronologique entre crochets, par exemple [1].
- Logbooks (Fichier journaux) affiche la boîte de dialogue Logbooks dans laquelle vous pouvez sélectionner un journal à afficher ou à imprimer.
- Load Logbook (Charger le fichier journal) affiche la boîte de dialogue Load Logbook qui vous permet de sélectionner un journal précédemment enregistré et de l'ouvrir.
- Next Window (Fenêtre suivante) active la fenêtre suivante de la série. Si la fenêtre est masquée par d'autres fenêtres, cette commande l'amène au premier plan. Si la fenêtre se réduit à une icône, Next Window l'affiche avec sa taille et sa position par défaut. La touche F11 est le raccourci clavier pour sélectionner Next Window.
- Previous Window (Fenêtre précédente) active la fenêtre précédente de la série. Si la fenêtre est cachée par d'autres fenêtres, cette commande l'amène au premier plan. Si la fenêtre se réduit à une icône, Previous Window l'affiche avec sa taille et sa position par défaut.
- Reset Current View (Réinitialiser la vue en cours) redonne à toutes les fenêtres de la vue en cours leur taille et leur position par défaut.

3
Mode thermodénaturation

Préparation d'une mesure de thermodénaturation 30
Essai de thermodénaturation 39

Ce chapitre décrit les outils essentiels pour élaborer une méthode de thermodénaturation, ainsi que pour acquérir et évaluer les données grâce au mode thermodénaturation du logiciel d'analyse biochimique. La première partie, "Préparation d'une mesure de thermodénaturation" page 30, donne des informations sur les étapes qui précèdent la mesure. Vous apprendrez à configurer le spectrophotomètre, à définir la programmation de température du régulateur de température à effet Peltier, et à choisir entre différentes options d'évaluation.

La seconde partie, "Essai de thermodénaturation" page 39, décrit la mesure thermique proprement dite, le suivi en temps réel et les possibilités de traitement des données offertes par le logiciel ChemStation.

Préparation d'une mesure de thermodénaturation

Avant d'effectuer une mesure de thermodénaturation, vous devez configurer votre système en fonction de votre application. Dans cette partie, vous apprendrez à configurer le spectrophotomètre, à définir la programmation de température du régulateur de température à effet Peltier et à élaborer une méthode de thermodénaturation pour analyser un échantillon d'ADN ou de protéine.

REMARQUE Le régulateur de température à effet Peltier Agilent 89090A doit être configuré avant de démarrer le mode thermodénaturation.

Démarrage du mode thermodénaturation

Pour lancer le mode thermodénaturation du logiciel d'analyse biochimique, choisissez Thermal Denaturation (Thermodénaturation) dans le menu Mode ou dans la liste déroulante Mode de l'interface graphique.

La Figure 2 montre l'interface graphique du mode thermodénaturation du logiciel ChemStation. Le mode en cours est indiqué dans la liste déroulante des modes de la barre d'outils. La barre d'outils comporte également le champ du nom de la méthode où s'affiche le nom de la méthode analytique en cours, ainsi que plusieurs boutons de raccourcis qui sont décrits dans le *Manuel de l'opérateur du système de spectroscopie UV-visible Agilent 8453*.

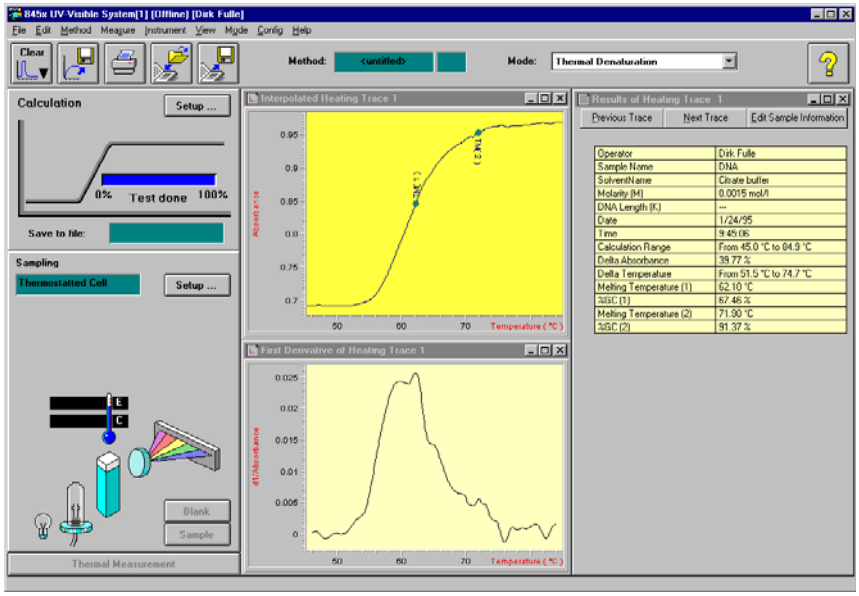


Figure 2 Interface graphique du mode thermodénaturation

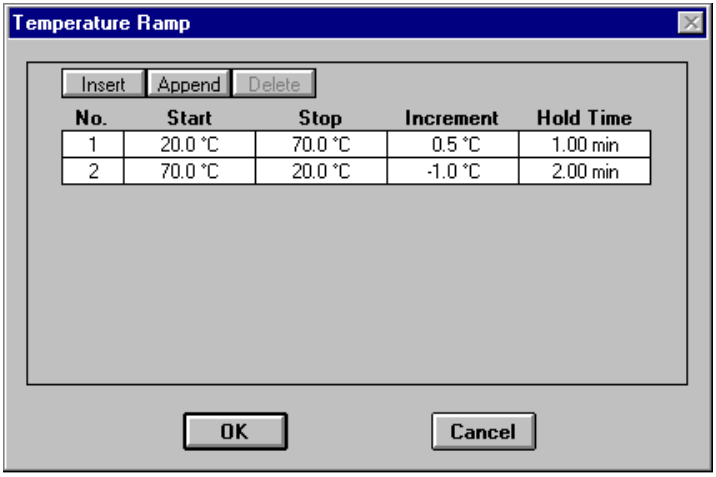
Dans le tableau de bord d'analyse (en haut), un bouton de raccourci ouvre la boîte de dialogue des paramètres de calcul (Calculation Parameters). La barre d'état bleue montre la progression de la mesure de thermodénaturation. Le tableau de bord d'échantillonnage possède un bouton de raccourci qui ouvre la boîte de dialogue de la rampe de température (Temperature Ramp), ainsi qu'une zone d'affichage de la température en temps réel.

Configuration du spectrophotomètre

Sélectionnez le menu Instrument du logiciel d'analyse biochimique pour configurer votre spectrophotomètre Agilent 8453 en vue d'une mesure de thermodénaturation. Le réglage des principaux paramètres est identique à celui du mode cinétique du logiciel ChemStation (voir "Configuration du spectrophotomètre" page 14).

Réglage de la programmation de température

En mode thermodénaturation, le régulateur de température à effet Peltier doit être défini comme système d'échantillonnage, ce qui se traduit par l'indication Thermostattable Cell (Cuve thermostatable) dans le champ Sampling (Echantillonnage) du tableau de bord de l'instrument. Cliquez sur le bouton Setup (Configurer) à côté du champ échantillonnage pour ouvrir la boîte de dialogue de la programmation de température et définir les rampes de température pour l'essai de thermodénaturation.



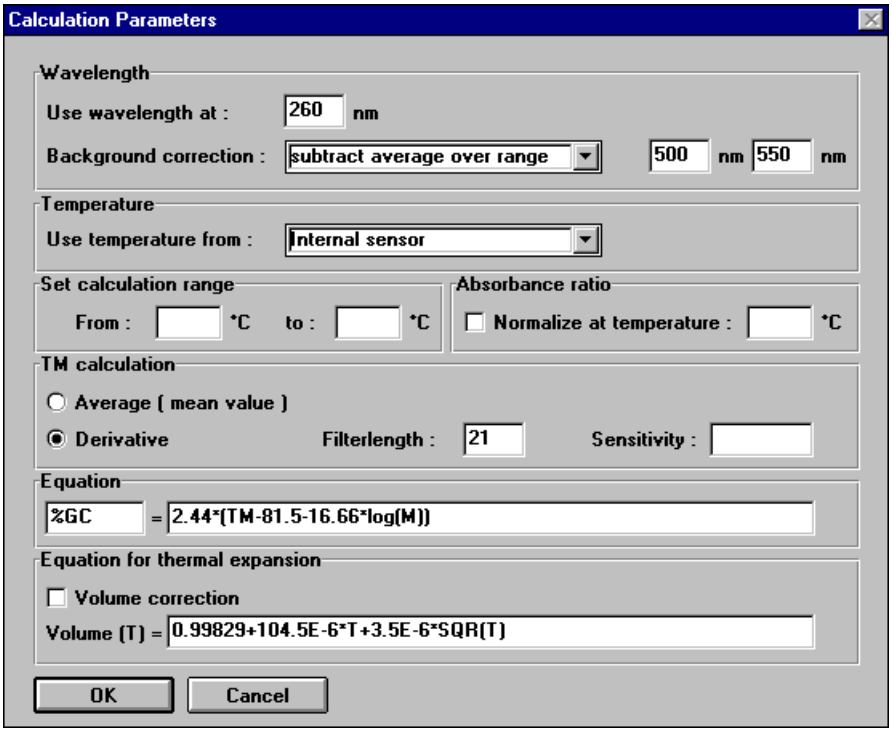
Chaque ligne de la boîte de dialogue définit une rampe de température.

- La colonne No. indique le numéro de la rampe ; les rampes sont numérotées par ordre.

- La colonne Start (Départ) indique la température de départ de la rampe. Quand vous ajoutez une rampe, la température de départ est la température finale de la rampe précédente.
- La colonne Stop (Fin) indique la température finale de la rampe. Quand vous ajoutez une rampe au programme, la température finale est indéfinie. La température finale maximale est 100 °C.
- La colonne Increment (Incrément) indique la différence de température entre deux paliers consécutifs. L'incrément par défaut est de 0,5 °C.
- La colonne Hold Time (Temps de maintien) indique le temps pendant lequel chaque palier de température est maintenu. La valeur par défaut est 1,00 min.

Configuration d'une méthode de thermodénaturation

Pour éditer les paramètres d'analyse de votre méthode de thermodénaturation, sélectionnez Calculation (Calculs) dans le menu méthode ou cliquez sur le bouton Setup (Configurer) du tableau de bord d'analyse de l'interface graphique. La boîte de dialogue des paramètres de calcul (Calculation Parameters) s'affiche.



Le champ Use Wavelength at: (Utiliser une longueur d'onde de :) vous permet de définir la longueur d'onde des données traitées à partir desquelles les valeurs d'amplitude sont extraites pour produire le résultat par longueur d'onde. La valeur par défaut est 260 nm. Si vous entrez une longueur d'onde pour laquelle il n'y a pas de mesure (par exemple un non-entier), les valeurs d'amplitude seront calculées par interpolation linéaire.

Le champ Background Correction (Soustraction du bruit de fond) vous permet de spécifier toute soustraction du bruit de fond qui sera appliquée au résultat par longueur d'onde pour calculer la fonction. Choisissez la flèche vers le bas et sélectionnez une procédure de soustraction du bruit de fond dans la liste déroulante. Les options sont les mêmes qu'en mode cinétique.

Temperature group (Groupe des températures) vous permet de sélectionner la source pour les mesures de température. Cliquez sur la flèche vers le bas et sélectionnez la source dans la liste déroulante. Si vous choisissez Internal sensor (Capteur interne), c'est la température du porte-cuve thermostatable,

mesurée par le régulateur à effet Peltier, qui sera utilisée pour évaluer les données. Si vous choisissez External sensor (Capteur externe), c'est la température de l'échantillon, mesurée par le capteur de température externe, qui sera utilisée pour évaluer les données.

Le groupe Set Calculation Range (Définir la gamme de calcul) vous permet de limiter à une plage de température donnée le calcul des résultats pour tous les tracés. Indiquez les limites inférieure et supérieure de la plage de température dans les champs From (de) et To (à).

Le groupe Absorbance Ratio (Rapport d'absorbance) vous permet d'indiquer une température à laquelle les valeurs d'absorbance sont normalisées ; le tracé de température est divisé par la valeur d'absorbance à la température indiquée. Sélectionnez Normalize at temperature (Normaliser à la température) pour activer la normalisation et indiquez la température de normalisation dans le champ adjacent.

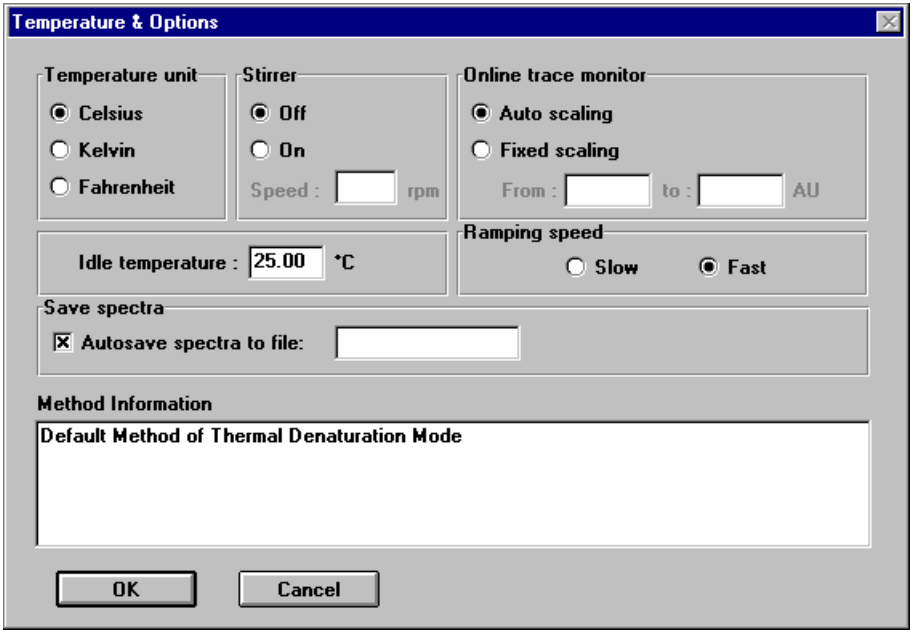
Le groupe Tm Calculation (Calcul de la température de fusion) vous permet de sélectionner la méthode de calcul pour la température de fusion.

- Choisissez Average (Valeur moyenne) pour calculer la température de fusion en prenant la température à la valeur moyenne d'absorbance au début de la plage de calcul et à la valeur moyenne d'absorbance à la fin de la plage de calcul.
- Choisissez Derivative (Dérivée) pour calculer la température de fusion en prenant la dérivée première du tracé de température. Dans les champs adjacents, entrez une longueur de filtre (Filter length) pour le calcul et une valeur de sensibilité (Sensitivity) pour l'édition des valeurs Tm.
- La valeur indiquée dans le champ Longueur du filtre fixe le nombre de points de données utilisés pour calculer chaque point dans le tracé. Cette valeur doit être un nombre impair compris entre 5 et 749 ; la valeur par défaut est 21. Plus le nombre de points est important, plus le degré de lissage du tracé est élevé.
- Seuls les maxima et minima qui atteignent au moins la valeur indiquée dans le champ Sensitivity (Sensibilité) et qui sont distincts des maxima ou minima voisins sont édités. Si vous laissez le champ vide, la sensibilité est réglée sur 1/1000 de la différence entre les valeurs maximale et minimale.

Le groupe Equation vous permet de définir l'équation qui servira à calculer les résultats.

- Tapez un nom de paramètre pour le résultat dans le champ situé à gauche de l'équation, et l'équation dans le champ de droite. Utilisez Tm (Température de fusion), M (Molarité de l'échantillon) et K (Longueur d'ADN).
- Le groupe Equation for Thermal Expansion (Equation de dilatation thermique) vous permet d'activer une correction de variation de l'absorbance due à l'éventuelle dilatation thermique de la solution. Sélectionnez Volume Correction (Correction de volume) pour indiquer que vous voulez qu'une correction de dilatation thermique soit effectuée. Tapez l'équation de correction de volume dans le champ Volume (T) =. Vous pouvez utiliser les mêmes opérateurs dans l'équation de correction de volume que dans le groupe Equation. Utilisez la variable T pour la température de l'échantillon.

Sélectionnez Temperature & Options dans le menu Method pour ouvrir la boîte de dialogue Temperature & Options. Dans cette zone, vous avez le choix entre plusieurs options pour votre essai de thermodénaturation.



- Le groupe Temperature Unit (Unité de température) vous permet de choisir les unités de mesure et contrôle de la température. Vous avez le choix entre Celsius (°C), Kelvin (K) et Fahrenheit (°F).
- Choisissez On dans le groupe Stirrer (Agitateur) pour activer l'agitateur. Quand il est activé, vous pouvez sélectionner la vitesse en t/min en tapant la valeur correspondante dans le champ Speed (Vitesse).
- Dans le groupe On-line trace monitor (Suivi des tracés en temps réel) vous pouvez spécifier l'échelle d'absorbance (axe des y) du suivi des tracés en temps réel. Choisissez Auto Scaling (Echelle auto) pour permettre à la ChemStation de calculer l'échelle d'absorbance à partir des intensités des signaux, ou choisissez Fixed Scaling (Echelle fixe) pour définir une échelle d'absorbance fixe. Si vous sélectionnez une échelle fixe, vous pouvez définir les limites inférieure et supérieure de l'échelle d'absorbance en tapant les valeurs correspondantes dans les champs From (de) et To (à).
- Dans le groupe Idle Temperature (Température de repos), éditez la température des échantillons entre deux analyses de thermodénaturation.
- Le groupe Ramping Speed (Vitesse de montée en température) vous permet de sélectionner la vitesse à laquelle la température augmente. Choisissez Slow (Lente) pour élever la température progressivement jusqu'à chaque palier de la rampe de température. Choisissez Fast (Rapide) pour amener très rapidement la température à chaque palier de la rampe de température.

REMARQUE Si les paliers sont larges, il y a un risque de dépassement de la température en mode rapide.

- Sélectionnez Autosave spectra to file (Enregistrer automatiquement les spectres dans un fichier) pour que les spectres acquis soient enregistrés. Tapez un nom de fichier dans le champ Autosave filename (Nom de fichier pour l'enregistrement automatique). Ce nom doit respecter les conventions DOS (8 caractères alphanumériques maximum). Si Autosave spectra to file est désactivé, les spectres ne seront pas enregistrés.
- Vous pouvez entrer une description de la méthode dans le champ Method Information (Informations méthode). Ce champ accepte tous les caractères alphanumériques et la description peut être aussi longue que vous le souhaitez. Le texte revient automatiquement à la ligne en fin de ligne.

La boîte de dialogue Set Individual Calculation Range (Définir individuellement les gammes de calcul) s'affiche quand vous sélectionnez la commande Set Individual Calculation Range dans le menu Method. Elle vous permet de définir une gamme de température pour calculer les résultats de thermodénaturation sur le tracé affiché. Tapez les limites inférieure et supérieure de la gamme de température dans les champs from (de) et to (à) de la boîte de dialogue.

Essai de thermodénaturation

Lorsque la rampe de température est définie et que les paramètres de la méthode ont été édités, vous pouvez commencer l' essai de thermodénaturation. Dans cette partie, vous trouverez des informations sur le suivi de la mesure en temps réel et sur les fonctions offertes par le logiciel ChemStation pour traiter vos données expérimentales.

Exécution d'un essai de thermodénaturation

Les mesures peuvent être lancées soit à partir du menu Measure de la barre de menus, soit en cliquant sur les boutons (Blank, Sample, Thermal Measurement) de la barre latérale de l'interface graphique, ou encore à l'aide de certaines touches de fonction.

Avant de pouvoir mesurer un spectre unique ou d'effectuer une analyse de thermodénaturation, vous devez mesurer un spectre de blanc en sélectionnant Blank (Blanc) dans le menu Measure, en appuyant sur la touche F4 ou en cliquant sur le bouton Blank (Blanc) de la barre latérale de l'interface graphique.

Pour mesurer un spectre unique de la solution versée dans la cuve et l'afficher dans la fenêtre des spectres d'échantillons (Sample Spectra), sélectionnez Sample (Single Spectrum) dans le menu Measure. Vous pouvez aussi mesurer un spectre unique en appuyant sur F5 ou en cliquant sur le bouton Sample (Echantillon) de la barre latérale de l'interface graphique.

La touche F7 et l'option Thermal Measurement (Mesure thermique) du menu Measure ou de la barre latérale de l'interface graphique permettent d'afficher la boîte de dialogue des informations échantillon (Sample Information).

- Tapez un nom d'échantillon dans le champ Sample Name. Le nom de l'échantillon figurera dans le tableau et les rapports.
- Tapez un nom de solvant dans le champ Solvent. Les informations concernant le solvant figureront dans le tableau et les rapports de résultats des tracés.

- Entrez la concentration de l'échantillon en mol/l dans le champ Molarity (M). La concentration figurera dans le tableau et les rapports de résultats des tracés ; elle est également utilisée pour le calcul %G-C.
- Entrez la longueur d'ADN de l'échantillon en paires de base (bp) dans le champ DNA Length (K). La longueur d'ADN figurera dans le tableau et les rapports des résultats de tracés et sera utilisée pour le calcul %G-C.
- Vous pouvez entrer un commentaire (par exemple une description de l'échantillon) dans le champ Comment.

Cliquez sur le bouton Run (Analyse) de la boîte de dialogue des informations échantillon pour démarrer l'acquisition et afficher la fenêtre All Spectra (Tous les spectres), la fenêtre Trace (Tracés) et la fenêtre Sample Information (Informations échantillon). Dans un premier temps le régulateur de température à effet Peltier amène le porte-cuve à la température de départ. Une fois le temps de maintien qui a été défini dans la boîte de dialogue de la rampe de température (Temperature Ramp) écoulé, le premier spectre est mesuré et le régulateur de température amène le porte-cuve à la température suivante de la rampe.

Pendant la mesure thermique, vous pouvez suivre l'acquisition des spectres et les tracés de température en temps réel dans les fenêtres All Spectra (Tous les spectres) et Trace (Tracé).

Lorsque la mesure de thermodénaturation est terminée ou interrompue par l'utilisateur, les données sont enregistrées comme spécifié dans la boîte de dialogue Temperature & Options. Les tracés sont évalués selon la procédure qui a été définie dans la boîte de dialogue des paramètres de calcul (Calculation Parameters). Les résultats sont affichés dans la fenêtre Result.

Evaluation de vos données de thermodénaturation

Lorsque l'analyse de thermodénaturation est terminée, vous avez la possibilité de réévaluer les données expérimentales. Du fait que des spectres complets ont été acquis pendant la mesure, tous les paramètres de la boîte de dialogue des paramètres de calcul peuvent être changés. Cliquez sur OK pour valider les changements. Les nouveaux résultats s'affichent dans la fenêtre Results of Heating Trace (Résultats du tracé de montée en température). Si les paramètres de la méthode ont été changés, le drapeau Mod apparaît dans la barre d'outils de l'interface graphique.

Le fait de cliquer sur le bouton Edit Sample Information (Editer les informations échantillon) dans la fenêtre des résultats du tracé de montée en température affiche la boîte de dialogue des informations échantillon. Elle vous permet d'entrer des informations sur vos échantillons, informations qui pourront être utilisées pour calculer les résultats.

Visualisation des résultats

Vous avez plusieurs options pour visualiser les données acquises et traitées, ainsi que les tableaux de résultats. Sélectionnez le menu View (Vue) qui propose les options suivantes :

- All Spectra (Tous les spectres) affiche dans la fenêtre Sample Spectra (Spectres des échantillons) tous les spectres acquis.
- Spectra of Current Trace (Spectres du tracé en cours) affiche dans la fenêtre Spectra of Current Trace (Spectres du tracé en cours) les spectres du tracé sélectionné.
- All Traces (Tous les tracés) affiche tous les tracés de température dans la fenêtre Temperature Trace (Tracé de température).
- Traces and Results (Tracés et résultats) affiche les fenêtres Time Traces (Tracés chronologiques) et Results (Résultats), ainsi que le tableau Method Summary (Résumé des méthodes).
- Measured Single Spectra (Spectres uniques mesurés) affiche dans la fenêtre Single Spectra (Spectres uniques) un spectre mesuré.
- Last Blank Spectrum (Dernier spectre de blanc) affiche la fenêtre Last Blank Spectrum (Dernier spectre de blanc).
- Tabulate Selected Spectrum/Trace (Tabuler le spectre/tracé sélectionné) affiche sous forme tabulaire les données du tableau des spectres pour le spectre sélectionné, ou celles du tableau des tracés chronologiques pour le tracé chronologique sélectionné. Ces tableaux peuvent également être affichés automatiquement en double-cliquant avec le bouton gauche de la souris sur un spectre ou un tracé chronologique à l'intérieur d'une fenêtre graphique, ou en appuyant sur Entrée si vous utilisez le curseur. Le titre du tableau indique le type de spectre (par exemple Sample (Echantillon), Standard (Etalon) ainsi que le numéro du spectre/tracé chronologique entre crochets dans la fenêtre, par exemple [1].
- Logbooks (Fichiers journaux) affiche la boîte de dialogue Logbooks dans laquelle vous pouvez sélectionner un fichier journal à afficher ou imprimer.

- Load Logbook (Charger le fichier journal) affiche la boîte de dialogue Load Logbook qui vous permet de sélectionner un journal précédemment enregistré et de l'ouvrir.
- Next Window (Fenêtre suivante) active la fenêtre suivante de la série. Si la fenêtre est masquée par d'autres fenêtres, Next Window l'amène au premier plan. Si la fenêtre se réduit à une icône, Next Window l'affiche avec sa taille et sa position par défaut. La touche F11 est le raccourci clavier pour sélectionner Next Window.
- Previous Window (Fenêtre précédente) active la fenêtre précédente de la série. Si la fenêtre est cachée par d'autres fenêtres, Previous Window l'amène au premier plan. Si la fenêtre se réduit à une icône, Previous Window l'affiche avec sa taille et sa position par défaut.
- Reset Current View (Réinitialiser la vue en cours) redonne à toutes les fenêtres de la vue en cours leur taille et leur position par défaut.

Index

A

ADN
  contenu CPG, 40
  longueur, 36, 40

B

barre d'outils, 12, 31
barre latérale, 13
boîte de dialogue Calculation Parameters, 31, 33, 40
boîte de dialogue Info & Options, 18, 22, 24
boîte de dialogue Instrument Parameters, 14
boîte de dialogue Temperature & Options, 36, 40
boîte de dialogue Time & Calculation, 18, 25

C

cinétique d'ordre zéro, 21
cinétique de premier ordre, 21
cinétique des réactions rapides, 15, 23
compensation de cuve, 24
correction de la lumière parasite, 21, 23
correction proportionnelle, 20

D

déclenchement externe, 23
delta AU, 21
dilatation thermique, 36
durée d'analyse, 20
durée d'intégration, 15

E

échelle automatique, 25
éditeur de configuration, 9
enregistrement automatique, 23
enregistrer automatiquement, 37
équation
  édition, 35

F

fenêtre des résultats, 25, 27
fenêtre des tracés chronologiques, 25
fichier journal, 41
fourchette de calcul, 21

G

gamme de calcul, 35
gamme de longueurs d'ondes, 14

I

incrémenter le cycle, 21
informations échantillon, 23, 26
inhibiteur, 26
installation
  logiciel, 8
interface graphique, 12, 31
intervalle entre longueurs d'ondes, 15

J

journal, 28

L

lampe au deutérium, 15
lampe au tungstène, 15
lampes, 15
longueur du filtre, 35
longueur du trajet optique, 17, 18

M

menu
  Config, 23
  Instrument, 14, 32
  Measure, 24
  Method, 18
  Mode, 12, 31
  View, 27
mesure
  temporelle, 14, 25
  thermique, 39
mesure à blanc, 24
méthode
  informations, 23, 37
  paramètres, 18, 26
  thermodénaturation, 33
multiplier la vitesse, 22

P

passeur de cuves, 16, 22, 26
point de données à rejeter, 23, 24
programmation/rampe de température, 31, 32, 40

Q

qualification de l'installation, 8

R

réglage des gains, 23, 24
régulateur de température à effet Peltier, 9, 16, 18, 32, 40

résultats mathématiques, 27

S

soustraction du bruit de fond, 19, 34
spectre de blanc, 27, 39, 41
spectres de compensation de cuve, 27
substrat, 26
suivi des tracés, 20
suivi en temps réel, 37
système d'échantillonnage, 16

T

température
  capteur externe, 35
  capteur interne, 34
  de repos, 37
  moyenne, 35
  unités, 37
température de départ, 33, 40
température de fusion, 35
  dérivée, 35
  sensibilité, 35
température finale, 33
temps d'intégration, 23
temps de cycle, 15, 21, 23
temps de cycle minimum, 21
temps de début d'analyse, 20
temps de maintien, 33
thermodénaturation, 31

U

utiliser une longueur d'onde, 19, 34

V

vitesse de l'agitateur, 37
vitesse de montée en température, 37
vitesse initiale, 21

www.agilent.com

Contenu de ce manuel

Avec le logiciel d'analyse biochimique ChemStation Agilent, le logiciel général s'enrichit de deux nouveaux modes : le mode cinétique et le mode thermodénaturation. Ces modes permettent d'effectuer des expériences de cinétique et de thermodénaturation avec le spectrophomètre Agilent 8453. Pour cela, il a été doté de fonctions de développement de méthodes d'analyse, de moniteurs en ligne pour visualiser en temps réel les expériences en cours, et enfin d'outils pour évaluer et traiter les données expérimentales.

Ce manuel contient les instructions pour installer le logiciel et des indications sur le matériel nécessaire pour les expériences de cinétique et de thermodénaturation. Il donne également des renseignements sur les principales fonctions du logiciel pour vous aider à résoudre vos problèmes d'analyse.

© Agilent Technologies Deutschland GmbH
2002-2003

Imprimé en Allemagne
10/2003

G1117-93008

Agilent Technologies